

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 14日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659520

研究課題名（和文） 筋ジストロフィー症に対する次世代治療開発基盤の確立

研究課題名（英文） Development of the next-generation medical treatment for muscular Dystrophy

研究代表者 平家 俊男 (HEIKE TOSHIO)
京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90190173

研究成果の概要（和文）：

筋ジストロフィー症に代表される筋変性疾患に対する根本的治療法は存在しない。新規治療として遺伝子治療が模索されているが、一部の筋変性疾患のみが対象となり、普遍性を持つ新しい治療展開が期待されている。近年、ヒト ES 細胞に加えて、ヒト iPS 細胞が作成され、その多能性幹細胞が有する骨格筋分化能を用いて、筋変性疾患に対する新規診療基盤の確立が模索されている。その1つは骨格筋幹細胞 (satellite 細胞) を作成し、移植医療への展開を進める方向であるが全身投与という難問が存在する。一方、近年の iPS 細胞作成技術の確立により、筋ジストロフィー症患者由来ヒト疾患特異的 iPS 細胞から骨格筋幹細胞、成熟細胞を作成することが可能となった。その手法を用い、骨格筋幹細胞 (satellite 細胞) 細胞死、枯渇を抑制する新規の分子を見い出す、ジストロフィン遺伝子に対して効率的なエクソスキッピングを引き起こす分子を同定する、などの新規の治療基盤開発が現実のものとなった。我々は、既に開発済みのマウス ES 細胞、マウス iPS 細胞を用いて骨格筋幹細胞 (satellite 細胞) を作成する基盤技術 (Mizuno Y FASEB J 24:2245:2010, Chang H FASEB J 23:1907:2009) をもとに、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞より、特異的に骨格筋を作成する基盤技術を開発した。(Awaya T, Heike T et al. PloS One 7:e51638 2012)。さらに、7名の筋ジストロフィー患者からの iPS 細胞作成にも着手しており (内6名に関しては iPS 細胞を作製済み)、疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究体制が整備済みである。

研究成果の概要（英文）：

diseases. Although gene therapy is partly in trial, the standardized therapies are still under investigation. Recently, the preparation procedures for human iPS cells have been set up. By using this strategy, various new studies for new treatments become practicable. For example, the research of small molecules which facilitate exon skipping in disease-responsible region, or which restore the survival of intrinsically-fragile satellite cells.

Recently, we have developed the differentiation procedures into mature muscle cells along with immature muscle cells (or satellite cells as stem cells) in human iPS cells, in addition to in mouse iPS cells (Awaya T, Heike T et al. PloS One 7:e51638 2012). Simultaneously, we are on the way to make stock of muscular dystrophy-specific iPS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：筋ジストロフィー、iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

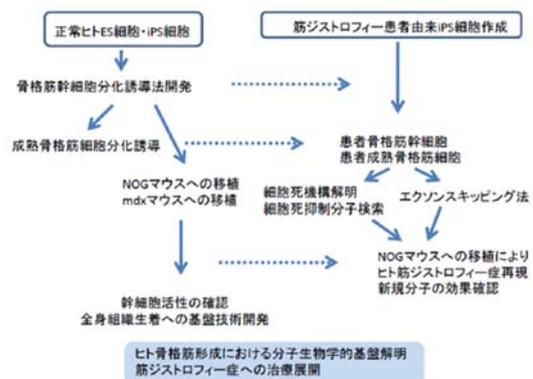
筋ジストロフィー症に代表される筋変性疾患に対する根本的治療法は存在しない。新規治療として遺伝子治療が模索されているが、一部の筋変性疾患のみが対象となり、普遍性を持つ新しい治療展開が期待されている。近年、ヒトES細胞に加えて、ヒトiPS細胞が作成され、その多能性幹細胞が有する骨格筋分化能を用いて、筋変性疾患に対する新規診療基盤の確立が模索されている。その1つは骨格筋幹細胞 (satellite 細胞) を作成し、移植医療への展開を進める方向であるが全身投与という難問が存在する。一方、近年のiPS細胞作成技術の確立により、筋ジストロフィー症患者由来ヒト疾患特異的 iPS細胞から骨格筋幹細胞、成熟細胞を作成することが可能となった。その手法を用い、骨格筋幹細胞 (satellite 細胞) 細胞死、枯渇を抑制する新規の分子を見い出す、ジストロフィン遺伝子に対して効率的なエクソスキッピングを引き起こす分子を同定する、などの新規の治療基盤開発が現実のものとなった。このためには、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞より、特異的に骨格筋を作成する基盤技術が開発されていることが必要である。我々はすでに、マウスES細胞、マウスiPS細胞を用いて骨格筋幹細胞 (satellite 細胞) を作成する基盤技術を開発している (Mizuno Y FASEB J 24:2245:2010, Chang H FASEB J 23:1907:2009)。さらに、我々は、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞から骨格筋幹細胞 (satellite 細胞) を作成する基盤技術については、マウスで培った基盤技術に大幅な改善を加味する必要があることを明らかにしたが、概ねその基盤技術も開発済みである。一方、筋ジストロフィー患者からのiPS細胞作成にも着手しており、疾患特異的iPS細胞を用いた研究体制が整備済みである。ヒト細胞の生着・機能解析が可能なNOGマウスを用いた研究実績も積み重ねている。

2. 研究の目的

ヒトES細胞、ヒトiPS細胞を用いて、骨格筋幹細胞 (satellite 細胞) を作成する基盤技術を、マウスで培った基盤技術を基に確立する。引き続き、筋ジストロフィー患者由来iPS細胞から骨格筋幹細胞 (satellite 細胞)、成熟骨格筋細胞作成を行い、遺伝子発現、蛋白発現、機能評価により筋ジストロフィー症病態の再現について確認する。NOGマ

ウスへの移植実験により移植ソースとしての有効性、安全性の確認を行うとともに、細胞死を抑制する種々の分子を網羅的にスクリーニングすることにより、骨格筋幹細胞 (satellite 細胞) の枯渇を特異的に防止する分子の同定を行う。また、効率的なエクソスキッピングを誘導する分子の同定を併せて行い、NOGマウスを用いた全身にわたるヒト骨格筋において治療基盤を検証する。筋ジストロフィー患者由来iPS細胞を用いて、筋ジストロフィー症患者の骨格筋幹細胞 (satellite 細胞)、成熟骨格筋細胞が有する特性が再現できるか否かについて、明確な検証結果は未だ存在しない。疾患特異的iPS細胞から疾患固有の病態を再現できるか否かは、今後の疾患特異的iPS細胞研究において大きな試金石となる。この問題を解決することにより、疾患特異的iPS細胞の医学研究への展開が現実のものとなり、筋ジストロフィー患者を含め難治性疾患患者に大きな福音となる。

3. 研究の方法



本研究の目的は、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞からヒト骨格筋幹細胞 (satellite 細胞) を特異的に作成する基盤技術を作成することが出発点である。その成果を基に、in vitroで、ヒト骨格筋幹細胞の枯渇を抑制する分子のスクリーニング、ヒト骨格筋細胞に対するエクソスキッピング等を誘導する分子のスクリーニングを行う。さらに、それらの成果を、ヒト細胞の生着が可能であるNOGマウスを用いて、その有効性、安全性について検証し、治療展開への可否について検証する。

平成23年度研究

1) ヒトES細胞、ヒトiPS細胞から骨格筋幹細胞を作成する
ヒトES細胞、ヒトiPS細胞を維持培養培地

で small cluster を形成させ、7～14日間培養により細胞凝集塊を作成した後、ゼラチンコートしたプレートに付着させ、さらに3週間 insulin、transferrin、selenium を含む無血清培地にて培養する。その後、培養液10%血清を添加した分化誘導培地にて培養を継続することにより、ヒト骨格筋が形成する。

骨格筋は発生起源において、中胚様のなかでも沿軸中胚様に属し、側板中胚様に属する心筋細胞と発生起源を異とする。沿軸中胚様の細胞表面マーカーとして血小板由来成長因子受容体 α (PDGFR α) が知られているが、上記の分化過程において、血小板由来成長因子受容体 α (PDGFR α) を効率よく誘導できる誘導法へと、サイトカイン添加等を加味し、改善を加える。さらに、骨格筋幹細胞の細胞表面マーカー遺伝子について知見が不足している。



マウス骨格筋幹細胞マーカーとなる VE-cadherin についてヒト骨格筋幹細胞マーカーとしての意義について検討するとともに、間葉系細胞マーカー CD73、ラミニン受容体であるインテグリン等を用いて分取し、ヒト骨格筋幹細胞活性を検討する。NOG マウス、mdx マウスを用いて、移植後長期間にわたってヒト骨格筋形成に寄与すること、骨格筋障害に反応してヒト骨格筋再生が誘導されること、二次移植等により骨格筋幹細胞活性を評価する。ヒト骨格筋分化誘導法、移植は、マウスでの実績をもとに栗屋が担当する。

2) 骨格筋幹細胞の全身組織への生着法の開発
筋ジストロフィー症は全身の骨格筋に障害が及ぶ疾患である。従って、骨格筋幹細胞移植に治療において、全身の骨格筋にくまなく骨格筋幹細胞を生着させる基盤技術開発は必須である。骨格筋再生は、骨格筋障害に引き続いて起きる修復過程に観察される。修復過程で作用する分子機構の解明を行い、その分子を操作することにより骨格筋幹細胞の生着を促進する基盤技術開発を行う。

3) 筋ジストロフィー症患者より作成した iPS 細胞を用い、上記の手法にて骨格筋作成を行う。

正常 iPS 細胞と同様に骨格筋幹細胞が作成できるか検討する。すでに筋ジストロフィー症 iPS 細胞は作成済みである。iPS 細胞作成にかかわった平家、分化システムを開発した栗屋が担当する。

平成24年度

4) 上記で作成した疾患特異的 iPS 細胞由来骨格筋幹細胞を用い、細胞障害を引き起こす分子、物理的ストレスに対し、正常 iPS 細胞由来骨格筋幹細胞、筋ジストロフィー症由来 iPS 細胞間において細胞死、寿命等の反応性を検討する。その結果を踏まえ、筋ジストロフィー症由来 iPS 細胞骨格筋幹細胞の脆弱性を克服する分子のスクリーニングを行う。さらに、エクソンスキッピングにより症状軽減を期待できる変異ジストロフィン遺伝子に対し、in vitro で効果的なエクソンスキッピングを達成するアンチセンスオリゴニュークレオチド、低分子化合物の絞り込みを行う。

5) 上記において開発した治療基盤技術を用い、NOG マウスを用いた in vivo において有効性の検証を行う。正常人 iPS 細胞から作成した骨格筋幹細胞の全身への生着効果について検討し、マウス全身の骨格筋に、ヒト骨格筋が生着するヒト化マウスを作成する。

6) 5) の基盤技術を用い、筋ジストロフィー症 iPS 由来骨格筋幹細胞を全身に生着させた NOG マウスを、もしくは、筋ジストロフィー症 iPS 由来骨格筋幹細胞を全身の多部位骨格筋に移植した NOG マウスを作成し、病態再現マウスとして研究に供する。4) で見出した筋ジストロフィー症由来 iPS 細胞骨格筋幹細胞の脆弱性を克服する分子、エクソンスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴニュークレオチド、低分子化合物について、全身の骨格筋において、その効果を確認する。

4. 研究成果

本研究期間において、既に関済済みのマウス ES 細胞、マウス iPS 細胞を用いて骨格筋幹細胞 (satellite 細胞) を作成する基盤技術 (Mizuno Y FASEB J 24:2245:2010, Chang H FASEB J 23:1907:2009) をもとに、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞より、特異的に骨格筋を作成する基盤技術を開発した。(Awaya T, Heike T et al. PloS One 7:e51638 2012)。さらに、7名の筋ジストロフィー患者からの iPS 細胞作成にも着手しており (内6名に関しては iPS 細胞を作製済み)、疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究体制が整備済みである。今後これらの資源を活用し、新規治療基盤の開発を行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕（計1件）

Awaya T, Kato T, Mizuno Y, Chang H, Niwa A, Umeda K, Nakahata T, Heike T.
Selective development of myogenic mesenchymal cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells.
PLoS One. 2012;7(12):e51638.

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平家 俊男 (Heike Toshio)

研究者番号：90190173

(2) 研究分担者

平松 英文 (Hiramatsu Hidefumi)

研究者番号：40362503

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：